

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/285470221>

Genetic linkage analysis of the DFNB63 locus in families with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss from...

Article · October 2015

CITATIONS

0

READS

14

6 authors, including:



m. amin Tabatabaiefar

Isfahan University of Medical Sciences

75 PUBLICATIONS 357 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Somayeh Reisi

Shahrekord University

26 PUBLICATIONS 29 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Genetic mapping of rare genetic disorders in inbred populations of Iran [View project](#)



Role of Immune Response in Different Clinical Expressions of Helicobacter pylori Infection [View project](#)

بررسی پیوستگی ژنتیک لوکوس DFNB63 در خانواده‌های دچار ناشنوایی غیرسندرمی اتوزوم مغلوب در استان‌های همدان و کهگیلویه و بویراحمد

پریا علی‌پور^۱، دکتر محمد امین طباطبایی‌فر^۲، دکتر سمیه رئیسی^۳، نجمه فتاحی^۱، اعظم پوراحمدیان^۱،
دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ناشنوایی یک اختلال حسی-عصبی است و یکی از شایع‌ترین نقص‌های مادرزادی می‌باشد که دارای بروز یک در هزار در بین نوزادان می‌باشد. مطالعات نشان داده است که پنجاه درصد موارد ناشنوایی، دارای علل ژنتیک و پنجاه درصد باقی‌مانده، دارای علل محیطی و ناشناخته است؛ قابل ذکر است که این نقص، بسیار ناهمگن می‌باشد. ناشنوایی در حدود ۷۰ درصد موارد، غیرسندرمی است و تنها نقص موجود در بیمار می‌باشد؛ حدود ۸۰ درصد این گونه ناشنوایی، به صورت اتوزوم مغلوب به ارث می‌رسد (ناشنوایی غیرسندرمی اتوزوم مغلوب). در این تحقیق، به بررسی نقش لوکوس DFNB63 (در ژن LRTOMT) در خانواده‌های دچار ناشنوایی غیرسندرمی اتوزوم مغلوب در دو استان ایران پرداختیم.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی توصیفی-آزمایشگاهی، به منظور تعیین شیوع جهش‌های DFNB63 در استان‌های غربی ایران، به بررسی نقش جهش‌های این ژن در ۱۵۰ فرد از ۳۰ خانواده در استان‌های همدان و کهگیلویه و بویراحمد پرداخته شد. خانواده‌های انتخاب شده در این مطالعه، دارای ازدواج خویشاوندی و حداقل ۲ یا تعداد بیشتری ناشنوا بوده، همچنین از نظر جهش GJB2 منفی بودند. آنالیز پیوستگی با انتخاب شش نشان‌گر STR (Short tandem repeats) مناسب برای این لوکوس، انجام شد.

یافته‌ها: با آنالیز پیوستگی خانواده‌های انتخاب شده، هیچ کدام، در نشان‌گرهای مورد نظر با لوکوس DFNB63 پیوستگی نشان ندادند. بر این اساس، جهش‌های ژن LRTOMT در ایجاد ناشنوایی در خانواده‌های مورد بررسی نقش نداشتند.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر پیشنهاد می‌کند که جهش‌های ژن LRTOMT، از نظر بالینی، اهمیت چندانی در بروز ناشنوایی در استان‌های مورد مطالعه ندارند.

واژگان کلیدی: DFNB63، ژن LRTOMT، ناشنوایی غیر سندرمی اتوزوم مغلوب، بررسی پیوستگی ژنتیک، ایران

ارجاع: علی‌پور پریا، طباطبایی‌فر محمد امین، رئیسی سمیه، فتاحی نجمه، پوراحمدیان اعظم، هاشم‌زاده چالشتی مرتضی. بررسی پیوستگی ژنتیک لوکوس DFNB63 در خانواده‌های دچار ناشنوایی غیرسندرمی اتوزوم مغلوب در استان‌های همدان و کهگیلویه و بویراحمد.

مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۶): ۱۳۰۸-۱۳۱۷

۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴- استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

Email: mchalesh@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتی

مقدمه

ناشنوایی، یکی از شایع ترین اختلالات حسی - عصبی در سراسر دنیا می باشد (۱). به طور تقریبی، ۷۰ میلیون بیمار در سراسر جهان از نقص ناشنوایی رنج می برند که در ۶۰-۵۰ درصد موارد، علت ژنتیک وجود دارد (۲). شایان ذکر است که با وجود بهبود سطح بهداشت جوامع، سهم ژنتیک همچنان در حال افزایش است (۳). حدود ۸۰ درصد موارد ناشنوایی ارثی، غیرسندرمی می باشند که الگوی اصلی وراثت آن اتوزومی مغلوب است (۴-۳).

برآورد شده است که بیش از ۱ درصد ژن های انسانی در روند شنوایی دخیل هستند. تاکنون بیش از ۱۳۰ لوکوس برای ناشنوایی غیرسندرمی شناخته شده است. بنا بر این، ناشنوایی یکی از ناهمگن ترین بیماری های ژنتیکی در انسان است و بیش از ۷۰ لوکوس DFNB برای ناشنوایی غیرسندرمی از نوع مغلوب اتوزومی، مشخص شده است (۷).

با وجود ناهمگنی جمعیتی ایران و وجود قومیت های مختلف در این جمعیت با نرخ متوسط ازدواج خویشاوندی ۳۸/۶ درصد، مطالعه ای این جمعیت می تواند فرصت مناسبی برای مطالعات ژنتیکی بر روی بیماری هایی مانند ناشنوایی غیرسندرمی مغلوب اتوزومی باشد. بیشتر مطالعات ایران بر روی ناشنوایی غیرسندرمی مغلوب اتوزومی، بر روی لوکوس خاصی به نام DFNB1 (GJB2) متمرکز است که شایع ترین دلیل ناشنوایی است. مطالعه ی بقیه ی لوکوس ها در جمعیت های بیماران مبتلا به ناشنوایی غیرسندرمی مغلوب اتوزومی، می تواند بینشی را در مورد بیماری زایی سایر لوکوس ها در ناشنوایی غیرسندرمی مغلوب اتوزومی

در این جمعیت ایجاد کند (۹-۸).

در این مطالعه، برای بررسی لوکوس DFNB63 مشخص کردن جهش های احتمالی، از روش بررسی پیوستگی ژنتیکی بهره گرفته شد. اساس بررسی پیوستگی ژنتیکی، نقشه ی اتوزیگوسیتی است که اولین بار توسط Botstein و Lander پیشنهاد گردید و روشی برای مطالعه ی ژنتیک بیماری های اتوزومی مغلوب می باشد (۱۰).

ژن LRTOMT واقع در لوکوس DFNB63 دارای ۱۰ اگزون می باشد که اگزون های ۵، ۷ و ۸ دارای دو چارچوب خواندن هستند. این ژن، دارای دو نوع رونوشت است. فرم کوتاه آن یک قالب باز خواندن دارد که تکرارهای غنی از لوسین، پروتئینی با عملکرد ناشناخته را کد می کند و LRTOMT1 یا LRRC51 نام دارد. فرم بلند آن دو قالب باز خواندن متناوب دارد و دو پروتئین متفاوت را کد می کند؛ یکی فرم کوتاه و دیگری پروتئین بلندتر. پروتئین بلندتر LRTOMT2، TOMT یا COMT2 نامیده می شود که در شنوایی بسیار اهمیت دارد و نقص آن باعث ناشنوایی می شود (۱۱).

Kalay و همکاران با آنالیز پیوستگی ژنوم به ترتیب با بررسی بیماران ناشنوای مادرزادی در خانواده های ترکیه ای، لوکوس DFNB63 را به عنوان لوکوس دخیل در ناشنوایی غیرسندرمی کشف کردند (۱۲). شواهد دال بر این است که ژن LRTOMT از ادغام دو ژن اجدادی Lrrc51 و Tomt در طی تکامل حاصل شده است. در مطالعه ای بر روی ۴ خانواده با منشأ ترکیه ای، تونس و پاکستانی - تونسی توسط Ahmed و همکاران، چهار جهش بیماری زا در ژن LRTOMT شناخته شد. با این وجود در کل، اطلاعات محدودی

در رابطه با نوع و فراوانی موتاسیون‌ها در ژن کد کننده ی COMT در جمعیت‌های مختلف وجود دارد (۱۱). در پژوهش حاضر، غربال‌گری این لوکوس با هدف تعیین سهم این لوکوس در دو استان همدان و کهگیلویه و بویر احمد انجام گردید.

روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA: در این مطالعه‌ی توصیفی - آزمایشگاهی مصوب شده در دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۳۰ خانواده دارای ۱۵۰ فرد ناشنوا از استان‌های همدان و یاسوج، از میان مراجعه کنندگان به مراکز بهزیستی انتخاب شدند. این افراد بر اساس معاینه‌ی بالینی توسط پزشک متخصص گوش، حلق و بینی و مشاوره‌ی ژنتیک، جزء موارد غیرسندرمی مغلوب اتوزومی ناشنوایی بودند. این خانواده‌ها دارای حداقل ۲ فرد ناشنوا بودند.

پس از تکمیل پرسش‌نامه و رضایت‌نامه‌ی کتبی، نمونه‌گیری از تمامی افراد خانواده انجام شد. روش نمونه‌گیری، تصادفی ساده بود. ۵ میلی‌لیتر نمونه‌ی خون از تمامی اعضای در دسترس ۳۰ خانواده گرفته شد و در لوله‌های حاوی

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. استخراج DNA به روش استاندارد فنل کلروفرم انجام گردید و با نانو دراپ کیفیت و کمیت DNA بررسی شد (۱۰). خانواده‌ها از نظر جهش در ژن GJB2 بررسی شدند و فقط خانواده‌هایی که از نظر این جهش منفی بودند، وارد مطالعه شدند.

انتخاب نشان‌گرهای مناسب، تعیین ژنوتیپ و بررسی پیوستگی ژنتیکی: نشان‌گرهای STR (Short tandem repeats) مناسب در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI، Genome browser و Map viewer و نیز پرایمرهای لازم جهت تکثیر آنها از طریق پایگاه داده‌ی NCBI UniSTS انتخاب شدند. معیار انتخاب نشان‌گرها فاصله از ژن، درجه‌ی چندشکلی آنها، دامنه و طول محصول PCR (Polymerase chain reaction)، و نیز هتروزیگوت بودن پدر و مادر برای یک نشان‌گر معین بود. همه‌ی نشان‌گرها دارای واحدهای تکراری دو نوکلئوتیدی بودند. مشخصات و اطلاعات مربوط به هر نشان‌گر جهت تکثیر، در جداول ۱ تا ۳ آمده است.

جدول ۱. نشان‌گرهای مورد استفاده برای لوکوس DFNB63 و ویژگی‌های آنها

نام نشان‌گر	پرایمر F (Forward)	پرایمر R (Reverse)	اندازه‌ی محصول (bp)
D11S4184	CCCAGCCTTACATATTCC	GCTGATGAGCAGAGGTAG	۲۷۷-۲۶۳
D11S4132	GTGCAAGTTTTGGCTTCGTC	ACTCCAGCCTGGGTGAAA	۲۱۴-۱۷۶
D11S4140	TGCAACAAGGTTCCACACT	CTTATGGGTGAGGGCACAG	۱۹۹-۱۸۹
D11S4139	TATAGACTTCAGCCCTGCTGC	CCTCTGTAGGATGCAGTTGG	۱۹۵-۱۵۱
D11S1314	TTGCTACGCACTCCTCTACT	GTGAAGGCAGGAAATGTGAC	۲۲۷-۲۰۹
D11S4162	GTTCTCCAGAGAGACAGCAC	GAGAGCAACACTATTGCC	۲۶۹-۲۶۳

جدول ۲. برنامه‌ی دمایی PCR (Polymerase chain reaction) نشان‌گرها

مراحل PCR	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
۱	۹۵	۴ دقیقه	۱
۲	۹۵	۴۵ ثانیه	
	۶۲-۵۳*	۴۵ ثانیه	۸
	۷۲	۴۵ ثانیه	
۳	۹۵	۴۵ ثانیه	
	۵۲	۴۵ ثانیه	۲۷
	۷۲	۴۵ ثانیه	
۴	۷۲	۷ دقیقه	۱

* دمای اتصال پرایمر برای هر نشان‌گر متغیر و در محدوده‌ی ۵۲-۶۳ درجه‌ی سانتی‌گراد بوده است.

PCR: Polymerase chain reaction

جدول ۳. مقادیر لازم برای Polymerase chain reaction

(PCR) نشان‌گرهای نزدیک ژن LRTOMT

مواد	غلظت	حجم (μl)
dH ₂ O		۱۷/۹
PCR buffer	۱۰ X	۲/۵۰
dNTP	۱۰ mM	۰/۵۰
MgCl ₂	۵۰ mM	۱/۰۰
Primer (F)	۱۰ pM	۰/۵۰
Primer (R)	۱۰ pM	۰/۵۰
Taq-DNA Polymerase	۵ unit/μl	۰/۱۰
DNA	۴۰-۵۰ ng/μl	۱/۵۰
حجم کل		۲۵/۰۰

dH₂O: Distilled water; PCR buffer: polymerase chain reaction buffer; dNTP: Deoxynucleotide triphosphate

سپس، با نیترات نقره رنگ‌آمیزی، باندها رؤیت و ژنوتیپ افراد تعیین گردید. برای محاسبه‌ی S-Link از نرم‌افزار Fast S-Link نسخه‌ی ۲/۵۱ و برای محاسبه‌ی نمره‌ی LOD (Logarithm of the odds score) پارامتری دو نقطه‌ای و چند نقطه‌ای به ترتیب از Super link نسخه‌ی ۱/۶ و Simwalk نسخه‌ی ۲/۹۱ استفاده شد (۱۴-۱۳).

در مورد خانواده‌های مشکوک به پیوستگی، رسم هاپلوتایپ (مجموعه‌ی ژنوتیپ نشان‌گرهای مجاور) با استفاده از نرم‌افزار HaploPainter نسخه‌ی ۰/۲۹/۵ صورت گرفت. این مرحله به منظور تأیید یا رد پیوستگی استفاده می‌شود (۱۵).

پس از مشاهده‌ی پیوستگی و تأیید هاپلوتایپ، یک نمونه‌ی بیمار از خانواده‌ی مورد نظر جهت تعیین توالی اگزون‌های ژن LRTOMT ارسال گردید (شرکت ماکروژن، کره‌ی جنوبی). جداول ۴ تا ۶، اطلاعات پرایمرهای اگزون‌های کد کننده‌ی ژن LRTOMT و اطلاعات لازم جهت تکثیر این اگزون‌ها را نشان می‌دهد.

در صورتی که برای هریک از خانواده‌های مورد مطالعه، نشان‌گرها بی‌معنی (Uninformative) بودند، از دیگر نشان‌گرهای موجود در منطقه‌ی ژنی مربوط استفاده گردید.

STRهای انتخاب شده در افراد مورد بررسی، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر گردید و به کمک ژل پلی‌آکریل آمید ۸-۱۲ درصد، با جریان ۵۰ میلی‌آمپر به مدت ۲-۴ ساعت الکتروفورز شد؛

جدول ۴. اطلاعات پرایمرهای اگزون‌های ژن LRTOMT

اگزون	طول محصول PCR (bp)	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	توالی پرایمرهای F و R (5'→3')
۵	۴۸۱	۶۰ ۵۷	F: AGTATGGCTGTGGAGGGTTG R: CAAGGAATGGAGGGACTTGA
۷	۳۷۰	۵۹ ۵۹	F: TGAGGTTCTCTGAAGGGTAGG R: GAGGAGAATGGTCCAGGACA
۸	۵۵۳	۵۵ ۵۰	F: AGTACACAGGCTTGAATC R: AATTCATCCAGTTAAGCAG
۹	۳۹۶	۶۲ ۶۰	F: GAGCTGCAGTGAGGCAGGTA R: GGAGAAGGAAGCACCTCCAC
۱۰	۶۷۴	۵۴ ۵۴	F: GAAATCACAATACTGATCCT R: TGATAGAACTTGACACTTGAG

PCR: Polymerase chain reaction

توارث اتوزومی مغلوب مورد تأیید بود. ارزش S-Link این خانواده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Fast S-Link نسخه‌ی ۲/۵۱، ۷-۲ برآورد شد (معنی S-Link ۱ یعنی نسبت Linkage به عدم Linkage تنها ۱۰ برابر است. این گونه خانواده‌ها را به طور معمول نباید Linkage نمود).

محاسبه‌ی S-Link به این منظور انجام شد که خانواده‌هایی با احتمال پیوستگی بیشتر، وارد مطالعه شوند. در ۳۰ خانواده‌ی مورد مطالعه، بعد از بررسی الگوی نشان‌گرها و با تکرار حداقل دو بار الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل آمید (برای خانواده‌های دارای ارزش S-Link بالاتر) پیوستگی برای نشان‌گرها در خانواده‌ی ۲۰ دیده شد. البته نشان‌گرهای مورد نظر به صورت نیمه معنی‌دار پیوستگی را تأیید کردند و یکی از نشان‌گرها پیوستگی را رد نمود (شکل ۱). در کل، پیوستگی به لوکوس DFNB63 با S-Link تقریبی ۲، با رسم هاپلوتایپ تأیید شد (شکل ۲).

جدول ۵. مقادیر و مواد لازم مورد استفاده در واکنش PCR (Polymerase chain reaction) اگزون‌های ژن LRTOMT

حجم (μl)	غلظت	ماده
۱۸/۹۰		dH ₂ O
۲/۵۰	۱۰ X	PCR buffer
۱/۰۰	۱۰۰ mM	MgCl ₂
۰/۲۰	۴۰ mM	dNTP
۰/۱۵	۱۰ pM	F primer
۰/۱۵	۱۰ pM	R primer
۲/۰۰	۲۰-۳۰ ng/μl	DNA
۰/۱۰	۵ unit/μl	Taq DNA polymerase
۲۵/۰۰	۲۵	حجم کل

dH₂O: Distilled water; PCR buffer: polymerase chain reaction buffer; dNTP: Deoxynucleotide triphosphate

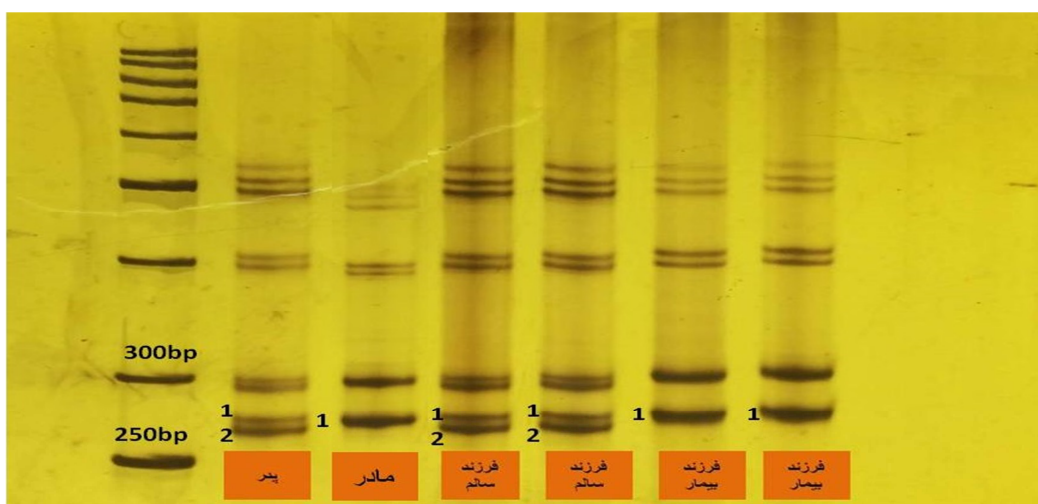
یافته‌ها

افراد مورد مطالعه در جمعیت مورد بررسی، ناشنوایی دوطرفه‌ی حسی - عصبی شدید تا عمیق داشتند. در ۸۵ درصد خانواده‌های مورد بررسی، سه نسل ازدواج خویشاوندی دیده شد و با توجه به داده‌های مربوط به شجره‌نامه، غیرسندرمی بودن ناشنوایی و الگوی

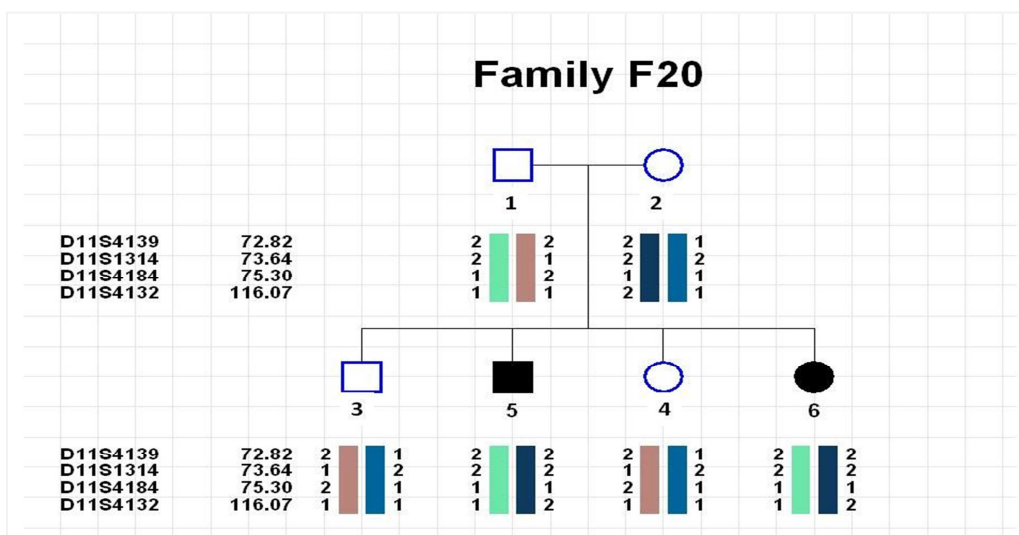
جدول ۶. برنامه‌ی دمایی مورد استفاده در واکنش PCR (Polymerase chain reaction) اگزون‌های ژن LRTOMT

مرحله	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
۱	۹۵	۴ دقیقه	۱
۲	۹۵	۱ دقیقه	۳۵
	*	۱ دقیقه	
	۷۲	۱ دقیقه	
	۷۲	۵ دقیقه	
۳	۷۲	۵ دقیقه	۱

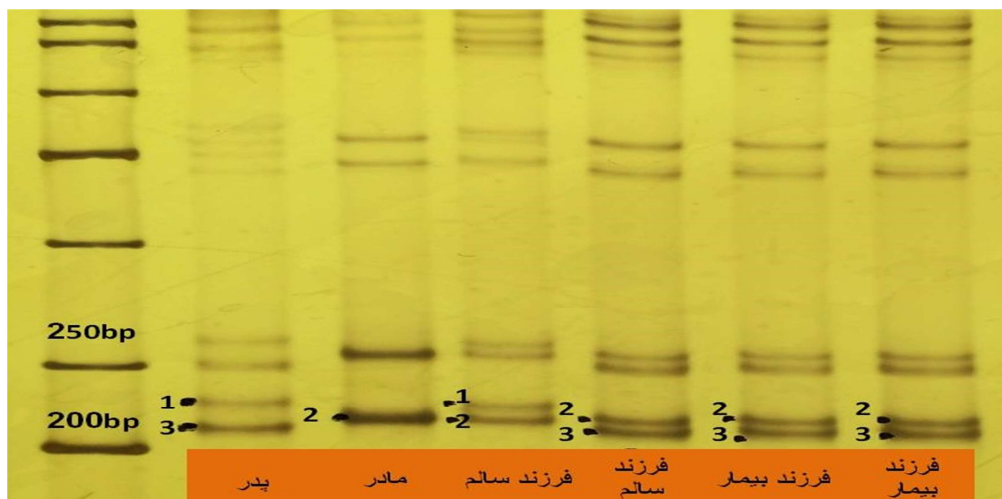
* دمای اتصال در اگزون‌های مختلف متغیر است.



شکل ۱. تعیین ژنوتیپ نشانگر D11S4184 (مربوط به لوکوس DFNB63) روی ژل پلی‌آکریل آمید، همان‌طور که در ژل مشاهده می‌شود، افراد بیمار الگوی هموزیگوت را در باندهای مربوط به نشانگر نشان دادند.



شکل ۲. هاپلوتا‌یپ مربوط به پیوستگی یکی از خانواده‌های مورد بررسی (خانواده‌ی شماره‌ی ۲۰). در صورت وجود پیوستگی، الگوی هاپلوتا‌یپ بیماران باید به صورت دو آلل یکسان باشد که در این شجره‌نامه بیماران هاپلوتا‌یپ یکسانی دارند و پیوستگی به لوکوس DFNB63 تأیید می‌شود. نقشه‌ی ژنتیکی نشان‌گرها بر اساس مارشیلد می‌باشد.



شکل ۳. تعیین ژنوتیپ نشانگر D11S913 (لوکوس DFNB93). این نشانگر در فرزندان ناشنوا (۷) به صورت هتروزیگوت است که دال بر رد پیوستگی می‌باشد.

بودند و به دلیل مشخص نبودن کامل فراوانی جهش‌های ژن LRTOMT در جمعیت ناشنوای ایران، در این مطالعه جهش‌های این ژن در بین جمعیت ناشنوایان استان‌های همدان و یاسوج بررسی شد. در بررسی چهار عضو مبتلای خانواده‌هایی با منشأ ترکیه‌ای، تونسی و پاکستانی - تونسی توسط Ahmed و همکاران، چهار جهش بیماری‌زا در ژن LRTOMT شناخته شد. در افراد مبتلای خانوادگی ترکیه‌ای، در DFNB63 یک جهش هموزیگوت در جایگاه پیرایش دهنده‌ی اگزون ۸ (c.358+4G>A) شناخته شد که موجب حذف اگزون ۸ و ایجاد کدون خاتمه‌ی زودرس و در نهایت باعث ایجاد پروتئین نابالغ کوتاه (LRTOMT2) می‌شود. در افراد مبتلای تونسی، یک انتقال 242G>A در ژن LRTOMT شناخته شد که باعث تغییر اسید آمینه‌ی شماره‌ی ۸۱ از آرژنین به گلوتامین (R81Q) می‌گردد و پیش‌بینی می‌شود که دمین COMT را در LRTOMT2 تغییر دهد. در افراد مبتلای خانوادگی تونسی، همچنین یک انتقال 313T>C هموزیگوت در اگزون ۸ این ژن شناخته

سپس، اگزون ۸ ژن LRTOMT که دارای بیشترین نقاط داغ شناخته شده است، تعیین توالی گردید. اما، جهشی در اگزون مورد نظر یافت نشد. پس از آن، به ترتیب همه‌ی اگزون‌های کد کننده‌ی این ژن و سپس اگزون‌های غیر کد کننده‌ی این ژن، تعیین توالی گردید. اما، جهشی در اگزون‌های مورد نظر یافت نشد. نبود جهش در DFNB63، ذهن پژوهشگران را به ژن‌های اطراف معطوف نمود. با توجه به این که لوکوس DFNB63 با لوکوس DFNB93 هم‌پوشانی دارد، احتمال وجود پیوستگی با این لوکوس بررسی گردید. به این ترتیب، با انتخاب نشان‌گرهای مناسب برای لوکوس DFNB93، نشان‌گرهای این لوکوس برای پیوستگی در خانواده‌ی ۲۰ بررسی شدند؛ اما پیوستگی در لوکوس DFNB93 رد شد. در شکل ۳، حاصل استفاده از ژل الکتروفورز برای یکی از نشان‌گرهای DFNB93 آمده است.

بحث

در این مطالعه، نمونه‌ها از نظر جهش GJB2 منفی

شد که باعث جانیشینی اسید آمینه‌ی ۱۰۵ از تریپتوفان به آرژنین (W105R) می‌شود و پیش‌بینی می‌گردد که دمین COMT را در LRTOMT2 تغییر دهد. در افراد مبتلای خانوادگی پاکستانی نیز یک انتقال $328G>A$ هموزیگوت در اگزون ۸ ژن LRTOMT کشف شد که باعث جانیشینی اسید آمینه‌ی ۱۱۰ از گلوتامین به لیزین (E110K) می‌گردد و پیش‌بینی می‌شود که دمین COMT را در LRTOMT2 تغییر دهد (۱۱).

در مطالعه‌ی Vanwesemael و همکاران، با بررسی خانواده‌های ایرانی با پنج نسل ازدواج خویشاوندی و با آنالیز Linkage برای یک گروه از لوکوس‌ها بر اساس شیوع آن‌ها در ایران، پیوستگی ژنتیکی تنها برای لوکوس DFNB63 مشاهده شد. در تمام افراد مبتلا، تغییر c.104delC مشاهده شد که به همراه پنج جهش از قبل گزارش شده، این جهش ششمین جهش گزارش شده در ژن LRTOMT می‌باشد (۱۶).

با توجه به بیشتر بودن فراوانی کل جهش‌های این ژن در ایران نسبت به بقیه‌ی کشورها، مطالعه‌ی این ژن در استان‌های مختلف کشورمان حایز اهمیت است.

تقی‌زاده و همکاران با بررسی ۱۵۷ دانش‌آموز ناشنوا که به صورت تک‌گیر مبتلا بودند، در چهار استان آذربایجان شرقی، گیلان، گلستان و کردستان، هیچ جهشی در این لوکوس پیدا نکردند. این مطالعه، نشان می‌دهد که احتمال وجود جهش در جمعیت‌هایی که به صورت خانوادگی مبتلا هستند، بیشتر است (۱۷). در مطالعه‌ی حاضر، به منظور بررسی دقیق‌تر، جهش‌های این ژن در جمعیت‌هایی که به صورت خانوادگی مبتلا هستند، بررسی شد.

در مطالعه‌ی Du و همکاران یک ترانسورژن R48L در بین یکی از ۱۹۲ خانوادگی غربال شده‌ی

ایرانی شناخته شد (۱۸). همچنین، در مطالعه‌ی طباطبایی‌فر و همکاران، از بین ۳۷ خانوادگی هفت استان کشور، ۲ خانوادگی با لوکوس مورد نظر پیوستگی نشان دادند. گرچه، فراوانی دقیق این لوکوس ممکن است بیشتر از این مقدارهای گزارش شده باشد؛ چرا که، فقط LRTOMT2 گزارش شده است و احتمال این که جهش‌های ایزوفرم ۱ این ژن، باعث این بیماری شده باشد، وجود دارد (۱۹). اما مطالعات بعدی آن‌ها نشان داد که جهشی در این ژن وجود ندارد. از سوی دیگر، با توجه به کشف لوکوس DFNB93 و هم‌پوشانی آن با لوکوس DFNB63، جهش در ژن مربوط (CABP2) گزارش شد (۲۰، ۱۵).

در این مطالعه، یک خانوادگی از بین ۳۰ خانوادگی به لوکوس DFNB63 پیوستگی نشان دادند، اما هیچ جهشی پیدا نشد. در حالی که در خانوادگی‌های با منشأ ترکیه‌ای، تونسی و پاکستانی-تونسی، جهش در آن گزارش شده است (۱۱).

در مطالعه‌ی حاضر، با وجود مشاهده‌ی پیوستگی در لوکوس DFNB63، جهشی در ژن LRTOMT یافت نشد و همچنین، به لوکوس DFNB93 (دارای هم‌پوشانی با لوکوس مورد نظر) پیوستگی نشان نداد. در پایان، با توجه به بررسی ۳۰ خانوادگی در استان‌های غربی کشور و عدم وجود جهش، می‌توان گفت که لوکوس DFNB63 دارای نقش کمتری در ایجاد ناشنوایی در این مناطق باشد و احتمال می‌رود، دلیل ایجاد ناشنوایی در این بیماران، بقیه‌ی لوکوس‌های درگیر در ناشنوایی باشد که شیوع بیشتری دارند. برای تعیین نقش دقیق‌تر این لوکوس، باید مطالعات را به مناطق دیگر و خانوادگی‌های بیشتر بسط داد تا بتوان نقش این لوکوس را به طور دقیق‌تر بررسی نمود.

تشکر و قدردانی

با تشکر فراوان از بیماران ناشنوا و خانواده‌های ایشان که در انجام این پژوهش همکاری نمودند. این مقاله مربوط به نتایج پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد می‌باشد. از

معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد جهت تأمین هزینه (با شماره‌ی ۱۶۰۰) و همه‌ی کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی که در این مطالعه ما را یاری کردند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull* 2002; 63: 73-94.
2. Tekin M, Arnos KS, Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet* 2001; 358(9287): 1082-90.
3. Van Laer L, Cryns K, Smith RJ, Van Camp G. Nonsyndromic hearing loss. *Ear Hear* 2003; 24(4): 275-88.
4. Genc GA, Konukseven O, Muluk NB, Kirkim G, Basar FS, Tuncer U, et al. Features of unilateral hearing loss detected by newborn hearing screening programme in different regions of Turkey. *Auris Nasus Larynx* 2013; 40(3): 251-9.
5. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 630: 16-31.
6. Dror AA, Avraham KB. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 411-37.
7. Van Camp G, Smith RJ. Hereditary hearing loss homepage [Online]. [cited 2015 May 13]; Available from: URL: <http://hereditaryhearingloss.org/>
8. Tabatabaiefar M, Alasti F, Zohour MM, Shariati L, Farrokhi E, Farhud D, et al. Genetic Linkage Analysis of 15 DFNB Loci in a Group of Iranian Families with Autosomal Recessive Hearing Loss. *Iran J Public Health* 2011; 40(2): 34-48.
9. Hashemzadeh Chaleshtori M, Farhud DD, Patton MA. Congratulation to margaret chan familial and sporadic GJB2-related deafness in Iran: review of gene mutations. *Iran J Public Health* 2007; 36(1): 1-14.
10. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res* 1989; 17(20): 8390.
11. Ahmed ZM, Masmoudi S, Kalay E, Belyantseva IA, Mosrati MA, Collin RW, et al. Mutations of LRTOMT, a fusion gene with alternative reading frames, cause nonsyndromic deafness in humans. *Nat Genet* 2008; 40(11): 1335-40.
12. Kalay E, Caylan R, Kiroglu AF, Yasar T, Collin RW, Heister JG, et al. A novel locus for autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment, DFNB63, maps to chromosome 11q13.2-q13.4. *J Mol Med (Berl)* 2007; 85(4): 397-404.
13. Moser T, Predoehl F, Starr A. Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. *Otol Neurotol* 2013; 34(6): 995-1004.
14. Ott J. Computer-simulation methods in human linkage analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 86(11): 4175-8.
15. Tabatabaiefar MA, Alasti F, Shariati L, Farrokhi E, Fransen E, Nooridaloui MR, et al. DFNB93, a novel locus for autosomal recessive moderate-to-severe hearing impairment. *Clin Genet* 2011; 79(6): 594-8.
16. Vanwesemael M, Schrauwen I, Ceuppens R, Alasti F, Jorssen E, Farrokhi E, et al. A 1 bp deletion in the dual reading frame deafness gene LRTOMT causes a frameshift from the first into the second reading frame. *Am J Med Genet A* 2011; 155A(8): 2021-3.
17. Taghizadeh SH, Kazeminezhad SR, Sefidgar SA, Yazdanpanahi N, Tabatabaiefar MA, Yousefi A, et al. Investigation of LRTOMT gene (locus DFNB63) mutations in Iranian patients with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Int J Mol Cell Med* 2013; 2(1): 41-5.
18. Du X, Schwander M, Moresco EM, Viviani P, Haller C, Hildebrand MS, et al. A catechol-O-methyltransferase that is essential for auditory function in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(38): 14609-14.
19. Tabatabaiefar MA, Shariati L, Montazer-Zohour M, Ashrafi K, Saffari-Chaleshtori J, Ghasemikhah R, et al. Mutation screening of GJB2 and GJB6 and genetic linkage study of three prevalent DFNB loci in Iranian families with Autosomal recessive non-Syndromic hearing loss. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2010; 12(2): 65-75. [In Persian].
20. Schrauwen I, Helfmann S, Inagaki A, Predoehl F, Tabatabaiefar MA, Picher MM, et al. A mutation in CABP2, expressed in cochlear hair cells, causes autosomal-recessive hearing impairment. *Am J Hum Genet* 2012; 91(4): 636-45.

Genetic Linkage Analysis of the DFNB63 Locus in Families with Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Loss from Hamadan and Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Provinces, Iran

Parya Alipour MSc¹, Mohammad Amin Tabatabaiefar PhD², Somayeh Reisi PhD³, Najmeh Fattahi MSc¹, Azam Pourahmadian MSc¹, Mortaza Hashemzadeh-Chaleshtori PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: Hearing loss is a sensorineural impairment and is one of the most widespread congenital impairments with a prevalence of one in thousand among children. Studies have shown that 50 percent of congenital hearing loss have genetic causes and the remaining 50 percent are due to environment and unknown reasons; in addition, it is noted that this impairment is very heterogeneous. Almost 70 percent of cases are nonsyndromic with hearing loss presenting as the only impairment. About 80 percent of this type of hearing loss is inherited in recessive manner (ARNSHL). In this study, we determined the role of DFNB63 locus in a series of families in two western provinces of Iran.

Methods: In this descriptive-laboratory study, to determine the prevalence of DFNB63 mutations in western provinces of Iran, we studied 150 individuals from 30 families in Hamadan and Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad provinces. The selected families in this study were consanguineous, had at least 2 patients, and were negative for GJB2 mutations. Linkage analysis was performed using six appropriate short tandem repeats (STR) markers.

Findings: With linkage analysis of selected families, no family was shown to be linked to the DFNB63 locus. It was shown that the LRTOMT mutations played no role in causing hearing loss in the studied families.

Conclusion: The present study suggests that LRTOMT mutations may not be clinically important in causing autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in the investigated provinces.

Keywords: DFNB63, LRTOMT gene, Autosomal recessive nonsyndromic hearing loss, Genetic linkage analysis, Iran

Citation: Alipour P, Tabatabaiefar MA, Reisi S, Fattahi N, Pourahmadian A, Hashemzadeh-Chaleshtori M. **Genetic Linkage Analysis of the DFNB63 Locus in Families with Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Loss from Hamadan and Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Provinces, Iran.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(346): 1308-17

1- Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

2- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Genetics, School of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

4- Professor, Cellular and Molecular Research Center AND Department of Medical Genetics, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Corresponding Author: Mortaza Hashemzadeh-Chaleshtori PhD, Email: Fattahi.najmeh@gmail.com